植 物 分 类 与 资 源 学 报 2015, **37** (6): 871~880
Plant Diversity and Resources DOI: 10.7677/ynzwyj201515048

国内外香稻资源遗传多样性研究*

余亚莹[1], 邵高能[1], 圣忠华[1], 蒋汉伟[2], 贺记外[1], 孙园园[2],
蔡怡聪[1], 胡培松[1**], 唐绍清[1**]
(1 中国水稻研究所/农业部水稻生物学与遗传育种重点实验室/水稻生物学国家重点实验室,
杭州 310006; 2 杭州师范大学, 杭州 310006)

摘要: 收集来源于16个国家和地区的345份香稻和89份非香材料开展了遗传多样性研究。利用分布于12条染色体上77对SSR标记, 共检测出573个等位基因位点, 多态信息含量(PIC)变幅为0.090~0.845, 平均为0.516; 基因多样性(GD)变幅为0.091~0.859, 平均为0.573; 主效等位基因频率(MAF)平均为0.540, 变幅从0.251~0.953。聚类分析和群体结构分析将434份材料分成3个亚群, 亚群与亚群间F_{ST}平均为-0.116, 变幅从-0.623~0.494; 据Nei's方法计算的亚群间遗传距离从0.207~0.355; 各亚群内的主效等位基因频率为0.408~0.746, 基因多样性变幅为0.354~0.699, 多态信息含量则从0.320~0.658。通过对18个水稻品种中的6个线粒体基因测序结果发现5个基因内不存在核苷酸的差异, 仅Mit4中包含了3个SNP的两种基因型, 可以作为反应籼粳分化与香味基因进化的重要功能标记。本研究较为系统地反映了不同香稻材料间以及与非香稻资源间的亲缘关系, 为进一步了解国内外香稻种质资源和优质香稻育种提供了重要的参考依据。

关键词: 香稻; SSR标记; 遗传多样性; 聚类分析
中图分类号: Q 16 **文献标志码**: A **文章编号**: 2095-0845(2015)06-871-10

Genetic Diversity of Global Aromatic Rice Varieties*

YU Ya-ying[1], SHAO Gao-neng[1], SHENG Zhong-hua[1], JIANG Han-wei[2], HE Ji-wai[1],
SUN Yuan-yuan[2], CAI Yi-cong[1], HU Pei-song[1**], TANG Shao-qing[1**]
(1 *State Key Laboratory of Rice Biology*, *Key Laboratory of Rice Biology and Breeding of Ministry of Agriculture*, *China National Rice Research Institute*, Hangzhou 310006, China; 2 *Hangzhou Normal University*, Hangzhou 310006, China)

Abstract: Genetic diversity of 434 rice accessions collected from 16 countries, including 345 fragrance rice varieties and 89 non-fragrance rice varieties, have been analyzed. A total of 573 alleles were detected by using 77 simple sequence repeats (SSR) primer pairs covering all rice 12 chromosomes. The value of allelic polymorphism information content (PIC) ranged from 0.090 to 0.845, with an average of 0.516 per locus; Gene diversity (GD) varied from 0.091 to 0.859, with an average of 0.573; The mean value of major allele frequencies (MAF) was 0.540, covering from 0.251 to 0.953. In addition, 434 rice accessions are divided into three sub-populations by cluster and population structure analysis, and F_{ST} between sub-populations showed a mean of −0.116, ranging from −0.623 to 0.494; The score of genetic distance calculated by Nei's method appeared from 0.207 to 0.355. Major allele frequencies within each sub-population distributed from 0.408 to 0.746, and gene diversity level from 0.354 to 0.699, while PIC from 0.320 to 0.658. Sequencing 6 mitochondrion genes in 18 rice varieties exhibited no different in 5 genes, whereas Mit4 contains a 3 SNPs in the gene body, which acts as an important marker to understanding the relation-

* 基金项目: 国家自然科学基金国际合作项目(31161140348), 浙江自然科学基金(LY14C130011)
** 通讯作者: Authors of correspondence; E-mail: hupeisong@caas.cn; sqtang@126.com
收稿日期: 2015-03-19, 2015-05-12 接受发表
作者简介: 余亚莹(1990-)女, 硕士研究生, 主要从事香稻资源收集及遗传多样性研究。

ship between *Indica/Japonica* differentiation and the evolution of fragrant gene. Finally, genetic diversity and mitochondrion gene sequencing would help to know about the origin of fragrant resource and benefit rice breeding.

Key words: Aromatic rice; SSR markers; Genetic diversity; Cluster analysis

水稻是世界上最重要的粮食作物之一，为全世界约21%人口提供了食物来源。近年来，随着人们生活水平的提高，稻米品质成为消费者考量的重要指标（Fitzgerald 等，2009；焦桂爱等，2010；黄菊等，2014）。香味是一种重要的品质指标，香稻在世界范围内已广为传播并普遍受到消费者的欢迎，其市场价格也比普通大米高出许多，这都为香稻遗传研究提供了更为广阔的市场前景（王军等，2008；赵国超，2010；Hashemi 等，2013）。

香稻资源丰富、栽培历史悠久，种植范围分布广泛，印度的Basmati系列、泰国的KDML105、日本的宫香、美国的Jasmine85和Della等都是颇有名气的香稻品种（Jain 等，2004；Pachauri 等，2010）。我国也是香稻的主要种植区域，种植历史悠久，水稻主产区都有适应当地气候的原始香稻资源，如云南的螃蟹谷、贵州的香禾、广西的靖西香糯等（谢黎虹等，2003；胡培松等，2006；陈远孟等，2008a）。但是，传统香稻在实际生产中存在地域性强、生育期长、抗倒伏和抗病能力差、产量低等缺点，大幅的限制了香稻的推广和生产应用（黄庭旭等，2006）。特别是在传统香稻选育和改良过程中，选用的亲本遗传背景相对单一，资源多样性差，一些珍贵的种质资源并没有得到充分挖掘和利用（黄发松等，1999）。因此，利用现代分子标记检测技术研究香稻资源的遗传多样性，结合分析特有香味基因在香稻亲本中的遗传变异，对有效利用和开发香稻遗传资源、提高杂交香稻育种亲本选配和杂种优势利用效率具有重要意义。

微卫星标记即简单重复序列（SSR，simple sequence repeats），是指存在于真核生物体由1～6个碱基对组成的简单重复序列，是现代生物学研究中常用的分子标记（Tautz，1989）。近年来，SSR标记由于其简便、稳定、多态性高、廉价等优点，广泛应用于评价水稻的遗传多样性和亲缘关系（马静等，2013）。利用DNA水平的分子标记对香稻资源进行遗传多样性与遗传结构的研究已有很多，如陈远孟等（2008b）关于广西香稻和南亚香稻多样性的研究；唐傲等（2009）选取了国内外370份香稻材料研究他们之间的遗传关系；朱勇良等（2012）对太湖地区香稻多样性的初析等。

已有的香稻资源遗传多样性研究主要局限于地域内资源的比较，对于更为广泛系统的香稻及非香稻种质资源之间的遗传关系了解甚少（Kaur 等，2015）。尤其是香稻资源受到地理环境、亚种间隔离、驯化过程等多方面影响，香稻种质多样性正在减少，为了更好地保存遗传资源和在育种实践中应用不同种质中的优良特征特性，研究和分析更为广泛的香稻资源遗传基础及多样性变得尤为重要。本研究对选自分布于16个国家和地区的345份香稻品种和89份非香稻材料进行遗传关系和群体结构分析，以及结合部分材料开展线粒体基因测序分析，旨在了解香稻材料间，以及与非香稻材料间的遗传多样性及群体结构，为香稻优异资源的引进、育种亲本的选配提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以345份香稻和89份非香稻种质资源为参试材料（表1），其中65份香稻材料来源于国外，余下280份香稻材料来源于国内各省市，89份非香型材料包括有18份温带粳稻、6份热带粳稻、17份籼稻、2份*AUS*和46份野生稻。所有实验材料均于2013年正季种植于中国水稻研究所富阳试验基地，种植与管理方法同大田生产。

1.2 DNA提取与SSR标记

分蘖盛期取参试材料单株叶片，采用CTAB法提取全基因组DNA，之后放置于-20 ℃冰箱保存。根据http://genome.cornell.edu/rice，www.gramene.org并参照前人文献挑选出均匀分布于全基因组12条染色体的77对SSR标记（表2）。然后将提取的DNA用于PCR扩增实验，PCR体系如下：DNA 1 μL，正反向引物（10 μmol·L^{-1}）各0.5 μL，dNTPs（10 μmol·L^{-1}）0.1 μL，10×PCR缓冲液1 μL，Taq酶0.2 μL，加ddH_2O补足10 μL。PCR程序如下：94 ℃下预变性2 min，95 ℃下30 s，55 ℃下30 s，72 ℃下30 s，35个循环，72 ℃下延伸5 min，PCR产物置于4度冰箱保存备用。PCR产物在8%非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳，电泳结束后银染显色并读胶。

表 1　434 份参试材料来源

Table 1　Geographical origin of 434 rice accessions used in this study

国外				国内						非香材料	
来源地 Origin	数量 No.	来源地 Origin	数量 No.	来源地 Origin	数量 No.	来源地 Origin	数量 No.	来源地 Origin	数量 No.	类型 Types	数量 No.
阿富汗	1	印度	14	安徽	2	黑龙江	14	辽宁	5	粳稻	18
澳大利亚	2	越南	3	北京	3	湖北	5	山东	7	籼稻	17
巴基斯坦	8	巴西	1	福建	5	湖南	27	陕西	11	热带粳稻	6
菲律宾	13	前苏联	1	广东	29	江苏	31	上海	2	野生稻	46
美国	4	印度尼西亚	1	广西	25	海南	4	四川	11	*AUS*	2
日本	1	韩国	1	贵州	20	吉林	6	云南	26		
泰国	4	孟加拉国	2	河北	2	浙江	9	台湾	3		
伊朗	9			河南	20	江西	11	其他	2		
国外香稻材料总计：65				国内香稻材料总计：280						非香材料总计：89	
总计：434											

表 2　SSR 多样性分析结果

Table 2　Genetic diversity results of SSR markers

标记 Marker	染色体 Chr.	主效等位基因频率 AF	有效观测值 N_{obs}	等位基因数 N_a	有效等位基因 N_e	遗传多样性指数 GD	多态信息含量 PIC
RM6470	1	0. 519	402	5	4. 631	0. 559	0. 465
RM272	1	0. 854	417	5	4. 804	0. 257	0. 237
RM292	1	0. 677	376	7	6. 065	0. 464	0. 392
RM129	1	0. 467	399	5	4. 597	0. 585	0. 498
RM7341	1	0. 545	412	2	1. 899	0. 496	0. 373
RM3285	1	0. 351	426	10	9. 816	0. 723	0. 678
RM5536	1	0. 441	410	9	8. 502	0. 707	0. 665
RM7382	2	0. 548	431	3	2. 979	0. 506	0. 389
RM5622	2	0. 509	401	11	10. 164	0. 601	0. 528
RM13069	2	0. 467	406	8	7. 484	0. 601	0. 521
RM13541	2	0. 908	418	8	7. 705	0. 172	0. 165
RM6424	2	0. 773	425	4	3. 917	0. 379	0. 350
RM6307	2	0. 626	416	7	6. 710	0. 513	0. 438
RM5807	2	0. 630	424	7	6. 839	0. 509	0. 434
RM60	3	0. 868	428	5	4. 931	0. 240	0. 231
RM175	3	0. 705	413	5	4. 758	0. 438	0. 372
RM14765	3	0. 715	417	7	6. 726	0. 456	0. 422
RM3204	3	0. 716	406	9	8. 419	0. 446	0. 402
RM3646	3	0. 286	323	9	6. 698	0. 798	0. 770
RM168	3	0. 395	403	16	14. 857	0. 784	0. 763
RM3585	3	0. 414	296	6	4. 092	0. 652	0. 587
RM7585	4	0. 529	418	8	7. 705	0. 601	0. 533
RM16335	4	0. 435	417	5	4. 804	0. 703	0. 656
RM5953	4	0. 503	392	5	4. 516	0. 571	0. 481
RM16720	4	0. 636	397	3	2. 744	0. 472	0. 372
RM5979	4	0. 559	353	7	5. 694	0. 617	0. 571
RM1018	4	0. 393	414	6	5. 724	0. 698	0. 644
RM348	4	0. 548	400	5	4. 608	0. 524	0. 419
RM5608	4	0. 412	392	8	7. 226	0. 681	0. 628
RM17804	5	0. 382	403	8	7. 429	0. 751	0. 715
RM289	5	0. 482	389	8	7. 171	0. 565	0. 471
RM7588	5	0. 916	398	8	7. 336	0. 160	0. 157
RM18614	5	0. 322	398	9	8. 253	0. 781	0. 750
RM7423	5	0. 651	424	4	3. 908	0. 473	0. 385
RM5818	5	0. 713	380	12	10. 507	0. 471	0. 449
RM6467	6	0. 393	399	6	5. 516	0. 694	0. 637
RM3805	6	0. 322	388	10	8. 940	0. 818	0. 798
RM19623	6	0. 586	412	2	1. 899	0. 485	0. 367
RM5745	6	0. 596	416	4	3. 834	0. 509	0. 412
RM19983	6	0. 953	434	5	5. 000	0. 091	0. 090

续表 2 Table 2 continued

标记 Marker	染色体 Chr.	主效等位基因频率 AF	有效观测值 N_{obs}	等位基因数 N_a	有效等位基因 N_e	遗传多样性指数 GD	多态信息含量 PIC
RM20071	6	0.608	426	4	3.926	0.502	0.407
RM7434	6	0.542	412	10	9.493	0.652	0.618
RM5814	6	0.591	416	7	6.710	0.591	0.548
RM20897	7	0.459	431	8	7.945	0.603	0.521
RM21242	7	0.533	406	6	5.613	0.607	0.543
RM542	7	0.395	351	10	8.088	0.785	0.763
RM3743	7	0.410	426	13	12.760	0.752	0.721
RM18	7	0.336	366	6	5.060	0.754	0.714
RM172	7	0.509	406	3	2.806	0.526	0.414
RM3702	8	0.370	392	13	11.742	0.748	0.710
RM310	8	0.251	404	17	15.825	0.859	0.845
RM22694	8	0.377	386	12	10.673	0.721	0.673
RM5999	8	0.500	315	6	4.355	0.605	0.529
RM6990	8	0.598	409	8	7.539	0.575	0.526
RM284	8	0.550	406	4	3.742	0.627	0.581
RM447	8	0.359	411	14	13.258	0.725	0.676
RM477	8	0.512	424	3	2.931	0.543	0.440
RM23769	9	0.511	372	3	2.571	0.505	0.383
RM23916	9	0.491	403	5	4.643	0.634	0.567
RM6854	9	0.883	416	7	6.710	0.214	0.204
RM6839	9	0.428	416	12	11.502	0.736	0.704
RM24718	9	0.630	410	8	7.558	0.525	0.463
RM3882	10	0.539	84	6	5.309	0.649	0.613
RM25152	10	0.348	368	12	10.175	0.731	0.683
RM25365	10	0.354	424	9	8.793	0.762	0.726
RM147	10	0.495	403	6	5.571	0.532	0.423
RM228	10	0.376	404	11	10.240	0.769	0.738
RM7173	11	0.815	303	8	5.585	0.320	0.300
RM332	11	0.368	401	10	9.240	0.732	0.690
RM7120	11	0.657	420	7	6.774	0.495	0.431
RM27154	11	0.359	389	9	8.067	0.729	0.682
RM2136	11	0.851	279	5	3.214	0.268	0.257
RM5568	12	0.701	421	13	12.611	0.456	0.405
RM27564	12	0.571	410	5	4.724	0.548	0.465
RM1036	12	0.631	343	4	3.161	0.514	0.443
RM519	12	0.416	418	13	12.521	0.711	0.665
RM6411	12	0.486	398	5	4.585	0.563	0.468
平均值 Mean	—	0.540	397.948	7.442	6.823	0.573	0.516

1.3 数据分析

根据 PCR 产物的电泳结果，每 1 对 SSR 引物检测 1 个位点，每 1 条多态性条带为 1 个等位基因，参照 http://www.gramene.org/提供的 SSR 信息对数据进行记录。SSR 数据使用 PowerMarker v3.25（Liu 和 Muse，2005）进行多态信息分析，得出 434 个材料的遗传相似系数矩阵，并采用 Neighbor-Joining 方法将结果进行聚类分析，得到的亲缘关系树状图在 MEGA v4.1 中输出图形并编辑。使用 STRUCTURE v2.2（Falush 等，2003）计算最适群体结构模型，设定亚群数（K）从 1~10，计算周期为 10 000，周期后重复次数为 10 000。

1.4 线粒体基因序列分析

根据网站（http://rmg.rice.dna.affrc.go.jp/）中公布的水稻线粒体基因信息，结合前人文献（Nakazono 等，1996；Zhang 等，2012；Xie 等，2014）共挑选出 6 个线粒体基因用于序列分析，用 Primer Premier 5.0 设计基因的测序引物如表 3 所示。挑选聚类分析中地理来源分布广的 12 个香稻品种和 6 个非香稻品种的 DNA 进行目的基因测序扩增，6 个非香稻品种包含 1 个 *AUS*，1 个温带粳稻，1 个籼稻，3 个野生稻。PCR 体系如下：DNA 5 μL，正反向引物（10 $\mu mol \cdot L^{-1}$）各 2.5 μL，dNTPs（2 $\mu mol \cdot L^{-1}$）5 μL，2×Buffer 25 μL，KOD Fx 酶 1 μL，加 ddH_2O 补足 50 μL。PCR 程序如下：94 ℃下预变性 3 min，98 ℃变性 10 s，55 ℃退火 30 s，68 ℃延伸 1 min，35 个循环，最后再延伸 8 min，扩增产物送公司测序，测序所获得基因组序列用 DNAMAN 和 Tassel5.0 进行分析。

2 结果

2.1 SSR 多样性

本实验中，利用 77 对 SSR 引物对 434 份水

稻种质资源进行遗传多样性分析（表 2）。共检测到 573 个等位基因，品种间不同位点等位基因数目为 2~17 个，平均为 7.442 个。其中 RM310 共检测到 17 个等位基因位点，在所有位点中多态性最好，其次为 RM168（16 个）和 RM447（14 个）。基因多样性（GD）变幅为 0.091~0.859，平均为 0.573。主效等位基因频率（MAF）从 0.251~0.953，平均为 0.540。

多态信息含量（polymorphism information content，PIC）用来衡量基因变异程度的高低，其衡量的标准为：PIC>0.50，该位点是高度多态性位点；0.25<PIC<0.50，为中度多态性位点；PIC<0.25，为低度多态性位点（Botstein 等，1980）。本试验中 77 对 SSR 引物的 PIC 变幅为 0.090~0.845，平均为 0.516，其中>0.50 的引物有 49 对，占 77 对引物中的 63.64%，而>0.25 的引物有 71 对，占所用引物的 92.21%，说明所用引物整体多态性好，能够完整展现各类型材料间的多态性。其中 RM310（0.845）的 PIC 最高，其次是 RM3805（0.798）、RM3646（0.770）和 RM542（0.763）（表 2）。

2.2 群体结构

通过 SSR 引物的统计结果，在 STRUCTURE v2.2 中计算得出最适群体数 $K=3$（图 1），即可以将 434 份参试材料分为 3 个亚群 POP1、POP2、POP3（图 2），计算单个参试材料分属于每个群体的概率值，定义材料在亚种中概率>0.5 即分属于该亚群，若材料在每个亚群中的概率值都<0.5，则将此材料列为中间型。434 份材料中，41 份属于 POP1，226 份属于 POP2，160 份属于 POP3，另外 7 份材料属于中间型。其中典型温带粳稻日本晴和典型籼稻 93-11 分属于 POP3 和 POP2，热带粳稻 D50 也分属于 POP3，说明 POP3 可能是温带粳稻和热带粳稻两种类型合并为粳稻类型；Kasalath、AUS373 为 *AUS* 类型水稻，在本试验中分属于 POP2 亚群中；另外，POP1 中只有野生稻这一种类型，有 41 份野生稻材料分属其中，且与其他两个亚群遗传距离较远，其余 5 份野生稻材料中有 2 份被分到籼稻类型中，有 3 份材料属于籼粳中间型。

基于 Nei's（1973）得到的遗传相似系数矩阵，用 Neighbor-Joining 方法做出 434 份参试材料的无根聚类树状图（图 3）。根据 STRUCTURE 得出的亚群分组，将每一个参试材料在图中以颜色区别并进行分组，可以看到此方法得出的组群与 STRUCTURE 中的三个组群类似。但是，在这两个软件计算的结果中，其中有些材料的分组存在差异。例如，在 STRUCTURE 中，绿色线条表示的属于 POP2 的个别材料在无根聚类树状图中出现在了 POP3 组群（蓝色线条）集中的区域，除了个别材料分类有差异的，其他参试材料在两个软件中的亚群分类基本一致。

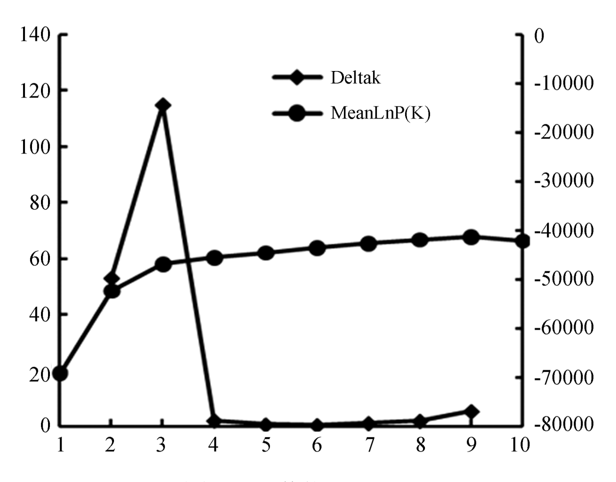


图 1 确定最适群体数目（K）的 ΔK 分布

Fig. 1 Distribution of ΔK which determines the optimal number of groups (K)

表 3 线粒体基因测序所用引物序列

Table 3 Sequencing primers for mitochondrion genes

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 Forward Sequence (5′->3′)	引物序列 Reverse sequence (5′->3′)
atp6	Mit1	GTGATCGCTACTAAAGATAG	ACTTGACCTTTTCTCCCGCCCCCTA
ccmC	Mit2	GCGAAATCCTTTGATTGTTT	TTCCTTTCTAGGTTGGTGGG
cob	Mit3	CAATTTCCATCAAGGCAAGG	GCAAACTCATCTGCTTGTAA
cox3	Mit4	AAAGAACTATCCCTTCCT	TCATAACAAAACTGTGCC
nad6	Mit5	GTCGTAATAGATCGACTTGA	CTTTACTGGAACTATTTTCG
rsp7	Mit6	GGACAGTAACGATCGCGTAA	AAAAGGATCAGGGTCAAACA

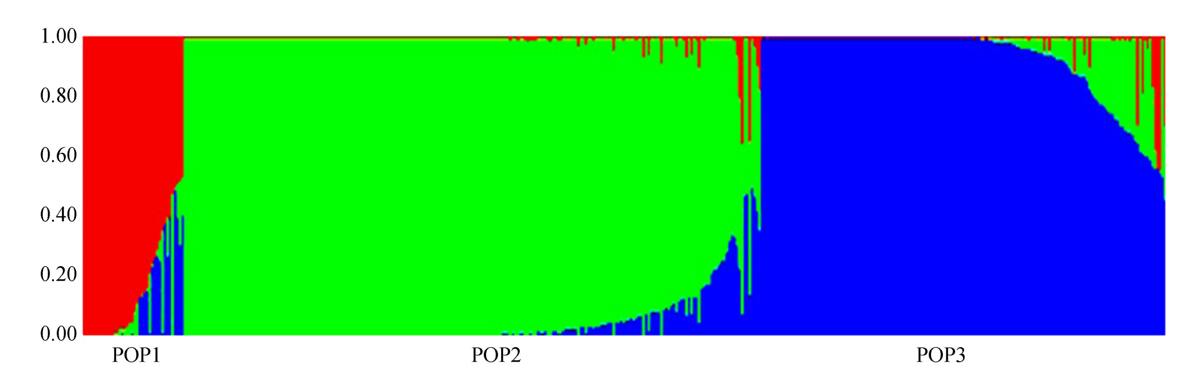


图 2 434 份材料的群体结构图（$K=3$）

Fig. 2 Population structure of 434 rice accessions ($K=3$)

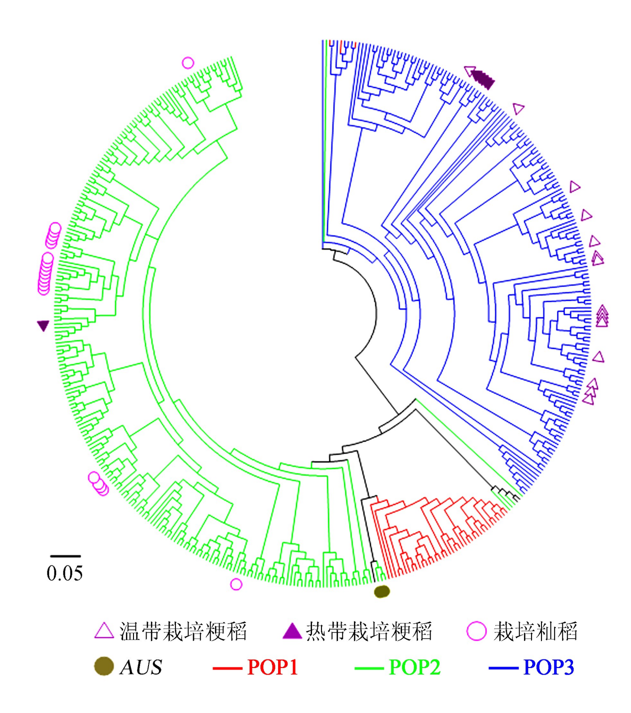


图 3 434 份材料的无根聚类树状图

Fig. 3 Unrooted neighbor-joining trees of 434 accessions

2.3 组群间的遗传关系

参试材料分为三个大的亚群，其中两两组群间的 F_{ST}表示亚群间亲缘关系的远近，本实验中组群间 F_{ST}平均为 -0.116，变幅为 -0.623 ~ 0.494，其中 POP2 与 POP3 之间存在最大的 F_{ST}（0.494）（表 4）。Nei's（1973）方法计算的亚群间遗传距离与 F_{ST}的结果相吻合，POP2 与 POP3 存在最大的遗传距离（0.355），而 POP1 与 POP2 之间的遗传距离（0.207）和 POP1 与 POP3 的遗传距离（0.209）都较小。另外，可以得出 POP3 与 POP1、POP2 之间无论是从 F_{ST}或者是遗传距离都具有较远的亲缘关系。根据 Neighbor-Joining 方法得出亚群间的遗传进化关系如图 4，与先前分析获得的遗传距离和 F_{ST}的结果相吻合。

表 4 亚群间的 F_{ST}和遗传距离

Table 4 F_{ST} and genetic distance between two sub-populations

亚群 Sub-POPs	POP1	POP2	POP3
POP1		-0.623	0.013
POP2	0.207		0.494
POP3	0.209	0.355	

注：表格上半部分是 F_{ST}，下半部分是遗传距离

Note: Pairwise F_{ST} appears above the diagonal and genetic distance below the diagonal

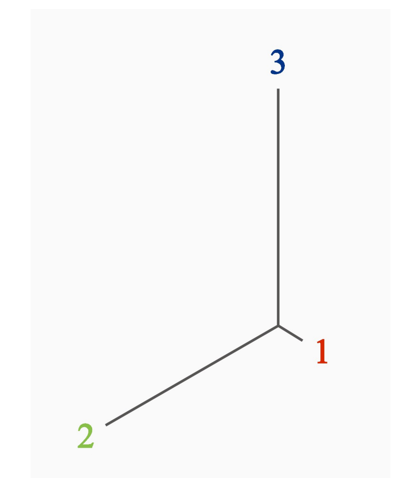


图 4 亚群间的聚类关系图

Fig. 4 Neighbor-joining trees of subpopulations

2.4 组群内的遗传多样性

根据划分的三个大类，对 3 个亚群内的遗传多样性进行了分析（表 5）。主效等位基因频率为 0.408~0.746，基因多样性（GD）变幅为 0.354~0.699，多态信息含量（PIC）则从 0.320~0.658。POP1 具有最高的 GD（0.699）、PIC（0.658）以

及等位基因数（6.403 个），说明 POP1 具有最高的遗传多样性。

表 5　亚群内的遗传多样性

Table 5　Genetic diversity for each sub-population

亚群 Sub-POPs	群体样本量 No.	主效等位基因频率 MAF	等位基因数 N_a	有效等位基因 N_e	遗传多样性指数 GD	多态信息含量 PIC
1	41	0.408	6.403	5.693	0.699	0.658
2	226	0.746	4.325	3.990	0.354	0.320
3	160	0.721	4.260	3.898	0.380	0.347
Mix	7	0.637	2.935	2.750	0.464	0.416

2.5　线粒体多样性

对 18 个品种 6 个线粒体基因测序结果分析发现，除了 Mit4 中存在三个碱基的差异，其余五个线粒体基因在这 18 个品种中不存在差异。Mit4 扩增产物为线粒体基因 *Cox3*，该基因编码细胞色素氧化酶亚基Ⅲ，是呼吸作用电子传递链的组成部分。可以将 18 个品种中的 *Cox3* 分为两种基因型（表 6），在 556、632、821 位置处均存在一个 T/C 碱基的差异。

3　讨论

香稻作为一种特殊的栽培稻，种植历史悠久，其中 *Badh2* 是迄今为止唯一一个被克隆的与香味相关的基因，它主要控制香味成分 2-乙酰-1-吡咯林（2-acetyl-1-pyrroline，2AP）的合成。不同科学家的研究表明，不同品种的 *Badh2* 序列存在很多位点的差异（Kovach 等，2009；Shao 等，2011，2013；Chen 等，2012）。在现代优质香稻的选育过程中，了解资源间的遗传亲缘关系会在育种过程中起到扩大遗传基础、丰富遗传背景的作用。

3.1　香稻资源的遗传多样性

实验选用的 434 份材料收集自 16 个国家和地区，其中国外香稻品种 65 份，占全部香稻品种的 18.84%，国内 280 份香稻材料来源于 23 个省市，实验材料地域覆盖面广。香稻材料中包含原始地方品种、选育品种、栽培品种、育种中间材料，材料类型广泛。本研究所选用的资源遗传背景丰富，包括不同的 *Badh2* 等位基因类型，如螃蟹谷、鸡血糯、八宝米等属于第 7 外显子 8 个碱基缺失的类型 *badh2.1*；第 2 外显子 7 个碱基缺失类型 *badh2.2* 的材料有卡鸡糯、苏香粳、武香粳 14 等（Shao 等，2013）；另外，89 份非香型材料中包含栽培籼稻、粳稻、*AUS* 以及野生稻，这些材料中既有常规种植品种，如中嘉早 17 和农林 8 号，也包含用于全基因组测序研究的水稻品种日本晴和 93-11，另外还选取了不同类型的野生稻，如：*O. rufipogon* Griff.、*O. longistaminata*、*O. barthii* 等，材料类型多样，其遗传背景范围广，在研究香稻资源多样性与群体结构时，能充分反映材料之间的遗传亲缘关系，也能从中探究香稻资源与其他材料的协同进化关系。

PIC 作为用来衡量基因变异程度的高低，它决定了遗传多样性的可靠程度。Garris 等（2005）在对 234 份亚洲栽培稻遗传亲缘关系进行分析研究时，亚洲普通栽培稻的平均 PIC 指数为 0.67，其中组群中的平均 PIC 指数为 0.37~0.52；白现广等（2009）关于云南地方香稻多样性研究中得出云南地方香稻的 PIC 从 0.211~0.772，平均为 0.580；以及 Jin 等（2010）研究 416 份水稻材料遗传多样性得到所有参试材料的平均 PIC 为 0.421，变幅范围是 0.047~0.722。本研究的多态性与上述水稻多样性研究结果基本相一致，保持在一个相对稳定的水平，所选用 77 对 SSR 引物中有 71 对引物达到中等高度多态性，占所选用的引物的 92.21%，且多态信息含量达到>0.5 的高水平，结果具有代表性及可靠性，有利于香稻资源遗传背景的系统分类。

3.2　群体结构分析

通过利用 77 对 SSR 标记对 434 份材料遗传多样性进行的整体分析，将其中收集于世界各地 345 份香稻材料分为了两个大的组群，且选用的非香型材料中有籼稻、粳稻的典型代表品种，其中典型温带粳稻日本晴、农林 8 号和典型热带粳稻 D50 分属于 POP3，典型籼稻品种 93-11、南京 11 被分在了 POP2 中，利用分子标记将香稻材料分为与栽培稻分类一致的两个亚群，与前人研究结果一致（Ni 等，2002；Shao 等，2013）。同时，从地理分布上来看，分属于粳稻类型的香稻材料都来自于我国常规的粳稻种植区域，而分属于籼稻类型的香型材料都来源于我国南方普遍种植籼稻的地区，如来源于陕西洋县的红香寸、江苏的苏御糯分属于 POP3，湖南的湘晚籼 13 号、

表6 18个品种线粒体基因 *Cox3* 测序结果

Table 6 Sequencing results of mitochondrion gene *Cox3* among 18 cultivates

亚群 SubPOP	品种名称 Cultivates	香味 Fragrance	类型 Types		Pos. 556		Pos. 632		Pos. 821	
POP1	YP8	−	*O. glaberrima*	A T G G G G … G T T T	T	A C T G G C … T A T T T A	T	G G T T C … T A T	T	T A T T … T G A
	YP15	−	*O. nivara*	A T G G G G … G T T T	T	A C T G G C … T A T T T A	T	G G T T C … T A T	T	T A T T … T G A
	678	−	*O. rufipogon*	A T G G G G … G T T T	T	A C T G G C … T A T T T A	T	G G T T C … T A T	T	T A T T … T G A
POP2	AUS373	−	*AUS*	A T G G G G … G T T T	T	A C T G G C … T A T T T A	T	G G T T C … T A T	T	T A T T … T G A
	93-11	−	籼稻	A T G G G G … G T T T	T	A C T G G C … T A T T T A	T	G G T T C … T A T	T	T A T T … T G A
	Kyeema	+		A T G G G G … G T T T	T	A C T G G C … T A T T T A	T	G G T T C … T A T	T	T A T T … T G A
	Pusa 33	+		A T G G G G … G T T T	T	A C T G G C … T A T T T A	T	G G T T C … T A T	T	T A T T … T G A
	香恢1号	+		A T G G G G … G T T T	T	A C T G G C … T A T T T A	T	G G T T C … T A T	T	T A T T … T G A
	Basmati370	+		A T G G G G … G T T T	C	A C T G G C … T A T T T A	C	G G T T C … T A T	C	T A T T … T G A
	Gil 1	+		A T G G G G … G T T T	C	A C T G G C … T A T T T A	C	G G T T C … T A T	C	T A T T … T G A
	卡鸡糯	+		A T G G G G … G T T T	C	A C T G G C … T A T T T A	C	G G T T C … T A T	C	T A T T … T G A
POP3	日本晴	−	粳稻	A T G G G G … G T T T	C	A C T G G C … T A T T T A	C	G G T T C … T A T	C	T A T T … T G A
	Punjab basmati	+		A T G G G G … G T T T	C	A C T G G C … T A T T T A	C	G G T T C … T A T	C	T A T T … T G A
	Dom Siah	+		A T G G G G … G T T T	C	A C T G G C … T A T T T A	C	G G T T C … T A T	C	T A T T … T G A
	Khazar	+		A T G G G G … G T T T	C	A C T G G C … T A T T T A	C	G G T T C … T A T	C	T A T T … T G A
	Salari	+		A T G G G G … G T T T	C	A C T G G C … T A T T T A	C	G G T T C … T A T	C	T A T T … T G A
	Tainung 72	+		A T G G G G … G T T T	C	A C T G G C … T A T T T A	C	G G T T C … T A T	C	T A T T … T G A
其他	PK3830	+		A T G G G G … G T T T	C	A C T G G C … T A T T T A	C	G G T T C … T A T	C	T A T T … T G A

Note: Pos. presents position in *Badh2*, and the A base in the start code showed Pos. 1

浙江的中香 1 号则分属于 POP2，说明在香稻驯化过程中，明显的受到普通栽培稻两个亚种驯化过程的影响。此外，POP1 中不包含香稻，只含有野生稻，说明香稻与野生稻亲缘关系较远，比较 POP2、POP3 与 POP1 的遗传距离可知，POP2 与 POP1 的遗传距离（0.207）比 POP3 与 POP1 的遗传距离（0.209）近，但他们都比 POP2 与 POP3 之间的遗传距离（0.355）近，说明籼稻和粳稻两种类型都可能是从野生稻中独立驯化而来，我们发现籼型香稻与野生稻距离更近（表 4），有 2 个野生稻材料在聚类分析中被划分到了 POP2 中，说明籼型香稻与这几个野生稻的亲缘关系较近，在驯化过程中，籼型香稻可能由此而来。

3.3　线粒体基因测序研究

本文选取了分布广泛且类型不同的 18 个品种对线粒体上的 6 个基因进行了测序分析，其中 5 个基因在品种间不存在核苷酸序列的差异，线粒体基因具有高度保守性。Mit4 测序结果比对分析发现品种间存在三个碱基差异的两种基因型，其中 3 份野生稻，籼稻 93-11 和 *AUS* 表现出相同的基因型，而温带粳稻日本晴则表现另外一种基因型，此结果与核基因组群体结构分析一致，认为籼稻与野生稻的亲缘关系更近。结合核基因组遗传多样性分析结果显示部分野生稻归属于 POP2，我们认为籼型香稻比粳型香稻离野生稻的亲缘关系更近，这与栾霁（2013）关于水稻线粒体 DNA 多样性的研究结果中认为普通野生稻与 *indica* 的亲缘关系比与 *japonica* 更近相一致。另外，POP2 的偏籼型香稻品种中存在两种不同基因型，而 POP3 中的香稻材料却只存在与 POP1 中相对且与日本晴一致的基因型，我们推断此位点的差异可能是由野生稻驯化成栽培稻的过程中产生，差异位点先产生于籼稻类型的栽培稻（POP2）中，然后才可能出现在粳稻类型水稻（POP3）中。因此，我们可以将 *Cox3* 基因的 Mit4 标记作为区分籼粳分化以及香味基因进化的重要功能标记。

3.4　香稻多样性的育种应用

在水稻杂交育种实践中，正确地选配亲本是杂交育种工作的关键。其中，选配亲本的重要原则之一就是选择不同生态型、不同地理来源和不同亲缘关系的品种作为育种亲本。由于亲本间的遗传基础差异大，杂交后代分离比较广，容易选出性状超越亲本和适应性较强的新品种（张天真，2003）。利用 DNA 分子标记了解香稻亲本材料间的遗传差异和亲缘关系，是研究水稻种质之间遗传差异的高效、准确的手段之一，为优质香稻育种提供了更多可供选择且亲缘关系较远的材料，对丰富我国香稻资源的遗传多样性以及改良和培育适应于我国生态环境的优质香稻品种具有重要的实践意义（杨旺兴等，2013）。本文研究选取了地理分布广泛、类型较多的香稻材料，对其遗传关系和群体结构进行了较为全面的分析，可为杂交香稻育种亲本选配、杂种优势的有效利用和开发新的遗传资源提供参考信息。

致谢　感谢中国水稻研究所魏兴华研究员在香稻种质资源，栽培稻及野生稻资源收集过程中所提供的帮助。

〔参　考　文　献〕

胡培松，唐绍清，顾海华等，2006. 水稻香味的遗传研究与育种利用［J］. 中国稻米，**6**：5

黄发松，胡培松，唐绍清等，1999. 食用优质稻米新品种的研究开发［J］. 中国稻米，**6**：24—26

栾霁，2013. 水稻线粒体 DNA 遗传多态性及相关基因表达的研究［D］. 长沙：湖南师范大学

谢黎虹，段斌伍，孙成效，2003. 香稻的渊源，香味及遗传［J］. 世界农业，11

张天真，2003. 作物育种学总论［M］. 北京：中国农业出版社，46

赵国超，2010. 香稻分子育种及香味形成分子机理的初步研究［D］. 上海：上海师范大学

Bai XG（白现广），Cheng ZQ（程在全），Lin ZL（蔺忠龙）*et al*., 2009. Comparison of genetic diversity between local cultivated aromatic and non-aromatic rice in Yunnan Province［J］. *Journal of Anhui Agricultural Science*（安徽农业科学），**10**（1）：56—59

Botstein D，White RL，Skolnick M *et al*., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms［J］. *American Journal of Human Genetics*，**32**（3）：314

Chen ML，Wei XJ，Shao GN *et al*., 2012. Fragrance of the rice grain achieved via artificial microRNA-induced down-regulation of *OsBADH2*［J］. *Plant Breeding*，**131**（5）：584—590

Chen YM（陈远孟），Zhang XJ（张向军），Chen CH（陈传华），2008a. Developm ent and current：research of aromatic rice［J］. *Guangxi Agricultural Sciences*（广西农业科学），**38**：597—600

Chen YM (陈远孟), Zhang XJ (张向军), Chen CH (陈传华) *et al.*, 2008b. Assessment of genetic diversity of aromatic rice (*Oryza sativa*) from Guangxi and South Asia by using SSR markers [J]. *Guihaia* (广西植物), **28** (2): 154—159

Falush D, Stephens M, Pritchard JK, 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies [J]. *Genetics*, **164** (4): 1567—1587

Fitzgerald MA, Mccouch SR, Hall RD, 2009. Not just a grain of rice: the quest for quality [J]. *Trends in Plant Science*, **14** (3): 133—139

Garris AJ, Tai TH, Coburn J *et al.*, 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. [J]. *Genetics*, **169** (3): 1631—1638

Hashemi FG, Rafii M, Ismail M *et al.*, 2013. Biochemical, genetic and molecular advances of fragrance characteristics in rice [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **32** (6): 445—457

Huang J (黄菊), Xu YF (许言福), Xie MX (谢米雪) *et al.*, 2014. Genotypes analyses of ten genes related to eating quality of twenty-three fragrant rice cultivars by molecular marker [J]. *Plant Diversity and Resources* (植物分类与资源学报), **36** (3): 381—387

Huang TX (黄庭旭), Jiang WQ (江文清), You QR (游晴如) *et al.*, 2006. Breeding and utilization of fragrant restoring line Dalixiang 15 of indica hybrid rice [J]. *Fujian Journal of Agricultural Science* (福建农业学报), **21** (2): 83—88

Jain S, Jain RK, Mccouch SR, 2004. Genetic analysis of Indian aromatic and quality rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using panels of fluorescently-labeled microsatellite markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, **109** (5): 965—977

Jiao GA (焦桂爱), Hu PS (胡培松), Tang SQ (唐绍清) *et al.*, 2010. Diversity analysis of RVA profiles of aromatic rice [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Science* (核农学报), **24** (1): 78—82

Jin L, Lu Y, Xiao P *et al.*, 2010. Genetic diversity and population structure of a diverse set of rice germplasm for association mapping [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, **121** (3): 475—487

Kaur S, Panesar PS, Bera MB *et al.*, 2015. Simple sequence repeat markers in genetic divergence and marker-assisted selection of rice cultivars: a review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **55** (1): 41—49

Kovach MJ, Calingacion MN, Fitzgerald MA *et al.*, 2009. The origin and evolution of fragrance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (34): 14444—14449

Liu K, Muse SV, 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. *Bioinformatics*, **21** (9): 2128—2129

Ma J (马静), Sun JC (孙建昌), An YP (安永平) *et al.*, 2013. Analysis of genetic diversity with population of Japonica rice from Ningxia using microsatellite markers [J]. *Journal of Plant Genetic Resources* (植物遗传资源学报), **14** (5): 826—832

Nakazono M, Ishikawa M, Yoshida KT *et al.*, 1996. Multiple initiation sites for transcription of a gene for subunit 1 of F1-ATPase (*atp1*) in rice mitochondria [J]. *Current Genetics*, **29** (5): 417—422

Nei M, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70** (12): 3321—3323

Ni J, Colowit PM, Mackill DJ, 2002. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers [J]. *Crop Science*, **42** (2): 601—607

Pachauri V, Singh MK, Singh AK *et al.*, 2010. Origin and genetic diversity of aromatic rice varieties, molecular breeding and chemical and genetic basis of rice aroma [J]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **19** (2): 127—143

Shao GN, Tang A, Tang SQ *et al.*, 2011. A new deletion mutation of fragrant gene and the development of three molecular markers for fragrance in rice [J]. *Plant Breeding*, **130** (2): 172—176

Shao GN, Tang SQ, Chen ML *et al.*, 2013. Haplotype variation at Badh2, the gene determining fragrance in rice [J]. *Genomics*, **101** (2): 157—162

Tang A (唐傲), Shao GN (邵高能), Jiao GA (焦桂爱) *et al.*, 2009. Comparative assessment of SSR diversity in aromatic rice germplasm [J]. *Hereditas* (遗传), **31** (4): 412—419

Tautz D, 1989. Hypervariabflity of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers [J]. *Nucleic Acids Research*, **17** (16): 6463—6471

Wang J (王军), Zhong WG (仲维功), Chen ZD (陈志德) *et al.*, 2008. Progress of studies on the fragrance of rice and its application [J]. *Journal of Jinlin Institute of Technology* (金陵科技学院学报), **24** (2): 53—57

Xie H, Wang J, Qian M *et al.*, 2014. Mitotype-specific sequences related to cytoplasmic male sterility in Oryza species [J]. *Molecular Breeding*, **33** (4): 803—811

Yang WX (杨旺兴), Xu XM (许旭明), Qi JM (祁建民) *et al.*, 2013. Genetic diversity of parents and derived lines based on phenotypic characters and SSR cluster analysis [J]. *Fujian Journal of Agricultural Science* (福建农业学报), **28** (3): 211—216

Zhang T, Hu S, Zhang G *et al.*, 2012. The organelle genomes of hassawi rice (*Oryza sativa* L.) and its hybrid in saudi arabia: genome variation, rearrangement, and origins [J]. *PLoS ONE*, **7** (7): e42041

Zhu YL (朱勇良), Xie YL (谢裕林), Huang LZ (黄凌哲) *et al.*, 2012. Establishment of SSR fingerprint M ap and preliminary analysis of genetic diversity among aromatic rice from Taihu and other Areasin China [J]. *Journal of Plant Genetic Resources* (植物遗传资源学报), **13** (4): 666—671